

学校编码：10384  
学 号：200126052

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 基于绿色荧光蛋白的均相荧光共振免疫 检测法的建立

**Establishment of homogeneous fluorescence resonance  
immunoassay based on green fluorescent protein**

指导教师姓名：夏宁邵 研 究 员

张 军 副研究员

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2004 年 8 月

论文答辩日期：2004 年 8 月

学位授予日期：2004 年 月

答辩委员会主席：

评阅人：

2004 年 8 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前 言 .....	5
1 荧光免疫分析 .....	6
2 抗体和小分子抗体 .....	10
3 绿色荧光蛋白 (GFP) .....	19
4 荧光共振能量转移 (FRET) .....	26
5 本研究的设计思路及目的、意义 .....	36
第二章 材料与方法.....	38
1 仪器 .....	38
2 材料.....	39
3 方法.....	43
第三章 结果与分析 .....	52
1 直接 FRET 检测法的建立.....	52
1.1 MA18/7-VH 和 MA18/7-VL 的克隆与表达.....	53
1.2 可变区抗体的活性检测.....	61
1.3 GFP 与 MA18/7 可变区融合蛋白的表达.....	64
1.4 抗体可变区片段偶联荧光淬灭剂.....	78
1.5 直接 FRET 法测定 HBV 抗原.....	82
2 竞争 FRET 检测法的建立.....	85
2.1 荧光淬灭剂标记 HBV pre-S1 抗原.....	85
2.2 检测体系的确定.....	86
2.3 竞争 FRET 法测定 HBV 抗原 .....	87
第四章 讨 论.....	89
小 结 .....	98
参考文献.....	99
论文发表情况 .....	109
致 谢.....	110

# Contents

<b>Abstract (in Chinese)</b>	1
<b>Abstract (in English)</b>	3
<b>Chapter 1 Preface</b>	5
1 Fluorescence immunoassay	6
2 Antibody and small molecular antibody	10
3 Green fluorescent protein (GFP)	19
4 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)	26
5 Schema, purpose and meaning of the research	36
<b>Chapter 2 Materials and methods</b>	38
1 Instruments	38
2 Materials	39
3 Methods	43
<b>Chapter 3 Results and analysis</b>	52
1 Establishment of the hFRIA direct detection system	52
1.1 Cloning and expression of MA18/7-VH and MA18/7-VL	53
1.2 Activity detection of the variable domain antibodies	61
1.3 Expression of the fusion proteins of GFP and the variable domains of MA18/7	64

1.4 The attachment of the variable domain antibodies and the fluorescence quenchers .....	78
1.5 Detection of antigens with the hFRIA direct detection system .....	82
2 Establishment of the hFRIA competitive detection system ...	85
2.1 The attachment of the HBV pre-S1 antigens and the fluorescence quenchers ... ..	85
2.2 Determination of the hFRIA competitive detection system .....	86
2.3 Detection of the HBV pre-S1 antigens with the hFRIA competitive detection system .. ..	87
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>89</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>98</b>
<b>References .....</b>	<b>99</b>
<b>List of papers.....</b>	<b>109</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>110</b>

## 摘 要

荧光共振能量转移 (FRET) 提供了一种独特的能够用于实时测量生物分子之间距离的方法, 在 1 ~ 10 nm 的空间范围内两个特定荧光团之间的距离或距离变化可以通过 FRET 技术得以确定, 因此获得了广泛的生物学应用。绿色荧光蛋白 (GFP) 及其一系列突变体能够与目的基因融合而表达 GFP 融合蛋白, 并且具有活体表达和检测的特点。由于其自身的稳定性和优良的光谱性质使之非常适合作为 FRET 的能量供体或受体, 并大大拓展了 FRET 在包括均相荧光免疫检测在内的应用范围。

完整抗体的重链可变区和轻链可变区等小分子抗体片段之间可以发生相互作用, 能够与相应抗原发生特异结合, 生成免疫复合物。用 GFP 和荧光淬灭剂分别标记相互作用的小分子抗体, 两种特异标记物之间发生 FRET, 根据 FRET 信息的变化可以确定均相体系中抗原的浓度。由此建立检测抗原的均相荧光共振免疫检测 (hFRIA) 方法。为实现此目的, 以对乙型肝炎病毒 (HBV) 前 S1 (pre-S1) 抗原的检测为模式, 建立检测 HBV pre-S1 抗原的 hFRIA 方法。

首先应用大肠杆菌表达系统分别获得了高效表达的 HBV pre-S1 鼠源单克隆抗体 MA18/7 的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 片段。生物传感器、竞争 ELISA 和间接 ELISA 测定均显示, VH 或 VL 均不能结合相应抗原, 但二者体外混合后可迅速非共价结合形成具有良好活性的可变区抗体 Fv。然后在大肠杆菌中以包含体的形式表达由 MA18/7 的 VH 或 VL 分别与 GFP 的荧光增强突变体 - EGFP 构成的一系列融合蛋白, 在经过变性和复性后, 利用 His 亲和层析柱进一步纯化。进一步性质分析表明, 在所获得的通过不同方式融合的 12 种 EGFP - VH/VL 融合蛋白中, 将 EGFP 的 C 末端通过由三个连续的丙氨酸组成的柔性 linker 与可变区抗体 VH 连接的方式得到的融合蛋白 GaH 能够最大限度的保持 EGFP 的荧光性质和可变区

抗体的抗原结合活性,因此可以将其作为 FRET 的能量供体。接着将 MA18/7 可变区抗体片段和 HBV pre-S1 抗原 C<sub>06</sub> 分别与多种荧光淬灭剂进行化学偶联。通过优化标记程序和染料 - 蛋白摩尔比,最终获得了能够保持亲本活性的轻链可变区标记抗体 QSY35-VL (QL)和标记抗原 QSY35-C<sub>06</sub> (QC),并分别作为 FRET 的能量受体。

融合蛋白 GaH 与标记蛋白 QL 共同构成均相荧光共振免疫直接检测体系。二者相互作用而发生 FRET。当加入不同浓度的 HBV pre-S1 抗原后,由于外加抗原与 Fv 片段结合而使 FRET 减弱,体系荧光强度的变化明显区别于不含抗原的对照溶液,而且随着抗原浓度的增加,荧光强度增长比在一定范围内呈线性增加。分别检测 HBV pre-S1 21 ~ 47 多肽及其重组抗原 C<sub>06</sub>,验证了该竞争 hFRIA 法的可行性。

在此基础上建立的均相荧光共振免疫竞争检测体系由融合蛋白 GaH、MA18/7 轻链可变区片段 ML1 和标记抗原 QC 共同组成。三者相互作用形成免疫复合物进而发生 FRET。当加入不同浓度的 HBV pre-S1 抗原后,由于外加抗原与标记抗原相互竞争而使 FRET 减弱,体系荧光强度的变化明显不同于不含抗原的对照溶液,而且随着抗原浓度的增加,荧光强度增长比在一定范围内呈现线性关系。分别检测 HBV pre-S1 21 ~ 47 多肽及其重组抗原 C<sub>06</sub>,验证了该竞争 hFRIA 法的可行性。

本研究基于 GFP 和小分子抗体,初步建立了可以用于检测抗原的直接 hFRIA 法和竞争 hFRIA 法。在整个检测过程中仅需监测一种能量供体 - EGFP 的荧光强度变化,实现了对目的抗原的快速检测,为小分子抗体在更大范围内应用奠定了基础。

关键词: 荧光共振能量转移; 绿色荧光蛋白; 小分子抗体

## Abstract

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) provides us a unique means for measuring the distances between the biological molecules in real time, which allows determination of the distances or distance changes between two given fluorochromes ranging from about 1 nanometer to 10 nanometers, so it has been enormously useful in variety of biological applications.

Green fluorescent protein (GFP) and a series of its mutants can be expressed and detected in the native *in vivo* context of living cells in fusion constructs with genes of interest and are considered as proper energy donors or accepters of FRET for their stability and remarkable spectra characteristics. The using of GFP has greatly expanded the range of applications of FRET including homogeneous fluorescence immunoassay.

Small molecular antibodies, such as the antibody fragments of heavy chain variable domains and light chain variable domains, are able to be found interaction and binding the corresponding antigens to form immune conjugate. When a pair of variable domain antibodies was separately labeled with GFP and fluorescence quenchers, FRET between two specifically attached labels would be observed. Then antigen concentrations in homogeneous system could be determined through the information changes of FRET. On the basis of this, a new method of homogeneous fluorescence resonance immunoassay (hFRIA) for detection antigens was developed. To accomplish this goal, an hFRIA method for detection hepatitis B virus (HBV) pre-S1 antigens was developed as a mode.

First of all, the heavy chain variable domain (VH) and light chain variable domain (VL) fragments of HBV pre-S1 mouse monoclonal antibody MA18/7 were expressed in a high level with *E.coli* prokaryotic expression system. The results of biosensor, competitive inhibition ELISA and indirect ELISA demonstrated that the VH or VL fragment alone couldn't combine with HBV pre-S1 antigen, while once they mixed *in vitro*, they could bind tightly to form the variable domain antibody Fv with good binding activity. And then a series of fusion proteins, consisting of VH or VL fragments of MA18/7 and the fluorescence-enhanced mutant of GFP (EGFP) respectively, were designed to express in *E.coli* as inclusion bodies. After primary purification and renaturation, the fusion proteins were further purified by His-affinity chromatography. Further characterization revealed that the protein GaH, constructed by a fusion way of the C-termini of EGFP and the N-termini of VH with a flexible linker consisting of three continuous Alanines was the best form which retained the fluorescent properties and the antigen binding activities of the native variable domain antibody among the obtained twelve EGFP-VH/VL fusion proteins with



different fusion ways, so it was made energy donor of FRET. The next was several fluorescence quenchers' chemical coupling with the variable domain antibody fragments and the HBV pre-S1 antigen C<sub>06</sub>. The labeled light chain variable domain antibody QSY35-VL (QL) and the labeled antigen QSY35-C<sub>06</sub> (QC) that retained the most of parent activities were finally obtained through labeling process and dye-to-protein molar ratio optimization and were made energy acceptor for FRET respectively.

The hFRIA direct detection system consisted of the fusion protein GaH and labeled protein QL together. FRET would occur with the binding of GaH and QL. When different concentrations of HBV pre-S1 antigens were added to the homogeneous system, the changes of fluorescence intensity were obviously differ from the contrast solution without any antigens because of the decline of FRET generated from the binding of the Fv fragment and the antigen. What's more, the linear increasing ratio of fluorescence intensity was found followed by the increasing concentration of antigens. To demonstrate the utility of the method, the HBV pre-S1 peptide 21-47 and recombinant antigen C<sub>06</sub> were detected with the measurement of HBV pre-S1 antigen.

The hFRIA competitive detection system consisted of the fusion protein GaH, the variable domain fragment of MA18/7 ML1 and the labeled antigen QC together. FRET would occur with the binding of the three above to form immune complex. When different concentrations of HBV pre-S1 antigens were added to the homogeneous system, the changes of fluorescence intensity were obviously differ from the contrast solution without any antigens because of the decline of FRET generated from the competition of the added antigens and the labeled antigens. What's more, the linear increasing ratio of fluorescence intensity was found followed by the increasing concentration of antigens. To demonstrate the utility of the method, the HBV pre-S1 peptide 21-47 and recombinant antigen C<sub>06</sub> were detected with the measurement of HBV pre-S1 antigen.

Based on GFP and small molecular antibody, this research had developed two means of hFRIA methods including the direct hFRIA and the competitive hFRIA. Only the fluorescence intensity changes of EGFP, energy donor for FRET, need to be monitored throughout the detection process, realizing fast detection for antigens with the methods, which would have provided a foundation with the use of small molecular antibody in more fields.

**Keywords:** Fluorescence resonance energy transfer; Green fluorescent protein; Small molecular antibody.

# 第一章 前 言

随着现代科学技术的迅猛发展，科研工作者开始把目光越来越多地投向与人类密切相关的健康问题，着力进行疾病预防、医学诊断、治疗药物等方面研究。纵观生命科学领域科学技术的发展历史不难看出，生物技术、医疗诊断等相关科技的迅猛发展，始终与生物化学的分析方法和分析技术的发展紧密相连。而生物研究极为重要的环节在于检测手段的提高，新型的检测仪器、检测试剂和检测方法的出现大大促进了生物研究向更广泛更深入的方向发展。

免疫检测技术是一种超微量的生物分析技术，它利用了抗原 - 抗体间免疫反应的高度亲和性和作为探针的标记物的高度可测性，能够对生物体内微量、超微量的物质进行准确的定量测量，具有操作简单、特异性好、灵敏度高等优点，是疾病诊断和医学研究的重要方法。按照标记物的不同，免疫分析主要可以分为放射性免疫分析（RIA）、酶免疫分析（EIA）、发光免疫分析（LIA）和荧光免疫分析（FIA）<sup>[1]</sup>。1941 年荧光作为一种新型标记物开始应用在免疫检测上，从此建立了以荧光标记物为探针的荧光免疫分析法。由于其具有高灵敏度和高选择性的特点，在生命科学中得到了广泛的应用，同时，生命科学的发展也对荧光免疫分析法提出了新的挑战，推动着荧光免疫分析法在仪器、方法及数据处理等方面的不断发展和完善，新的荧光分析方法不断涌现，在生命科学中的应用也越来越广泛和深入。

荧光免疫分析的基本流程可划分为四个主要环节：分析样品制备、荧光探针标记、分析方式设计、分析信号检测<sup>[2]</sup>。为解决荧光免疫分析中遇到的问题，更好的发展和完善荧光免疫分析法，就应当从这四个主要环节着手。传统意义上的免疫分析法是一种利用抗体作为分析试剂的特殊试剂分析法，虽然抗体是蛋白质分析中非常有价值和不可或缺的工具，但是准备过程费时费力。因此分析试剂的选择不应当仅仅局限在完整抗体，荧光标

记对象开始变得多元化，单链抗体、单域抗体等小分子抗体越来越多的进入人们的研究视野。荧光标记物更是随着各种新型荧光物质的开发而在选择上趋向多样化。近年来研究中广泛应用了一种迄今为止唯一的活体标记物——绿色荧光蛋白，这种“活”的荧光物质及其多种突变体进一步拓宽了荧光免疫分析的应用范围。而多种研究手段的采用，如利用荧光物质之间的特性产生的荧光共振能量转移现象进行生物大分子的结构和生物大分子之间的相互作用分析，更是大大促进了荧光免疫分析的发展。

现分述如下。

## 1. 荧光免疫分析

荧光是染料吸收一种波长的光线，发出更大波长的光线的物理过程。处于基态的荧光色素受到外来光的照射而吸收足够的能量，而使色素外层电子处于激发态。这种激发态电子经过无辐射跃迁到第一能级后随着进一步跃迁而回落到基态，同时伴随着能量以可见光的辐射形式释放，即荧光（图1）。荧光吸收给予的能量后即刻引起发光，停止能量供给后则瞬即停止（持续时间为  $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ s}$ ）。荧光分析法为免疫检测提供了许多强有力的分析手段，使其具有独到的优点，首先，荧光的方法原理决定了其具有高的灵敏度和巨大的潜力；其次，荧光有多种荧光参数，如荧光量子产率、荧光寿命、荧光各向异性等；第三，荧光有多种检测技术，如同步荧光、导数荧光、偏振荧光、荧光动力学分析法、三维荧光光谱分析及相分辨荧光、时间分辨荧光分析等。因此基于荧光的应用变得越来越广泛和卓有成效，大大地推动了分析技术的进步和发展。

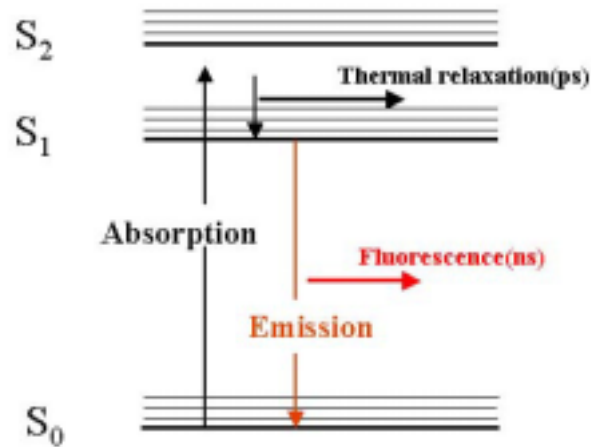


图1 荧光发生的机理示意图

(引自 Amersham Bioscience product catalog , 有改动)

Figure 1 Mechanism of fluorescence to occur

1941 年 Coons 等首次报道用异硫氰酸荧光素标记抗体，检查小鼠组织切片中的可溶性肺炎球菌多糖抗原。这是荧光分析法应用于免疫检测的开始。由于荧光分析的高灵敏度和高选择性，能够提供比较丰富的光谱信息，因而对于在分子水平上研究细胞过程，研究药物同核酸的相互作用，生物活性物质同蛋白质的相互作用，以及研究蛋白质的结构和机能方面，荧光分析法提供了一种非常重要而有效的工具。随着免疫化学技术和荧光分析方法的发展，迄今该方法已不再局限于早期的荧光抗体技术，已发展成为一门完整的免疫学方法，即免疫荧光技术。其应用也不仅局限于对体液或组织中各种抗原的定位和检测，还可以用于检测和定位抗体。免疫荧光技术分为两大类：一类是荧光素标记的抗体对细胞、组织切片或其他标本中的抗原（或抗体）进行鉴定和定位检测，可在荧光显微镜下直接观察实验结果或是应用流式细胞仪进行自动化分析检测；另一类方法是以荧光素标记抗体或抗原，用于体液标本中抗原或抗体的测定，称为荧光免疫测定（Fluorescence immunoassay，FIA）。

20 世纪 70 年代以来，在传统荧光抗体技术的基础上，根据放射免疫和

酶免疫测定的原理，发展建立了各种荧光免疫测定法，是荧光分析法应用于免疫分析而产生的一类分析方法，其灵敏度很高，采用化学方法将荧光染料标记好的抗体（或抗原）与组织或细胞中的相应抗原（或抗体）结合，荧光标记物可以直接测定，可用于定性或定量的测定抗原或抗体。荧光免疫分析法结合了免疫反应的特异性和荧光分析的高灵敏度等特点，不仅应用于细菌、病毒、原虫、蠕虫及真菌的鉴定和相应的疾病的诊断外，而且还广泛应用于血清抗体、抗原的检查，自身免疫疾病的研究与诊断，病理组织学抗原、抗体和补体的鉴定及定位，及肿瘤免疫与诊断等。同时荧光免疫分析在环境、农业及食品检测中也受到关注。

荧光免疫分析中荧光的来源大致可分为内源荧光和外源荧光两种：前者是利用物质自身发射的荧光进行测定；后者是利用某些荧光物质分子，使其与荧光较弱或不显荧光的物质特异性共价或非共价结合，形成发荧光的复合物后进行测定，即“荧光探针技术”。随着生命科学研究向分子水平的深入，近年来荧光探针技术突飞猛进。原因是蛋白质等大分子的天然荧光是在紫外区域，且光量子产率很小，因此检测条件苛刻，灵敏度低。利用荧光探针技术可使荧光发射移向可见光区，并使强度增强，方便了测量，提高了灵敏度。荧光免疫分析中常用的荧光标记物为荧光化合物、荧光底物或稀土螯合物。

荧光化合物是指一类吸收激发光的能量产生荧光，并能作为染料使用的有机化合物。适用于抗体标记的荧光化合物需具备以下条件：（1）应具有能与蛋白质分子形成稳定共价键结合的化学基团，或易于转变成此类基团而不破坏其荧光结构；（2）荧光效率高，与蛋白质的结合的需要量很少；（3）与抗体或抗原结合后，应不影响其免疫学特异性；（4）结合物产生的荧光颜色与背景组织的自发荧光对比鲜明，能够清晰的判断；（5）荧光素与蛋白质的结合方法简单、快速，游离的荧光素及其降解产物容易去除；（6）结合物在一般的储存条件下性能稳定，可保存较长时间。常用的荧光化合物有 FITC、TRITC 等（表 1）。

表 1 常见的荧光标记物性质

Table 1 Characters of usual fluorescent labels

名称	中文名称	最大吸收光 波长 ( nm )	最大发射光 波长 ( nm )	荧光颜色
FITC	异硫氰酸荧光素	495	520	黄绿色
RB200	四乙基罗丹明	570 ~ 575	595 ~ 600	橙红色
TRITC	四甲基异硫氰酸 罗丹明	550	620	橙红色
Cy3	吖啶碳花青苷	550	570	红色
Coumarin	香豆素	360	450	蓝光
Texas red	德克萨斯红	600	630	红色
PE	藻红蛋白	490	595	红色

近年来用稀土元素（镧系元素）的铕离子（ $\text{Eu}^{3+}$ ）和铽离子（ $\text{Tb}^{3+}$ ）等代替荧光素标记抗体或抗原，将时间分辨技术引入生物检测领域，建立了时间分辨荧光免疫分析法。这类离子探针具有荧光寿命长、斯托克斯位移大，发射峰窄、激发和发射理想等特点。将具有双功能基团的镧系元素螯合物作示踪剂，来标记抗原或抗体。当解离下来的镧系元素与特制的扩增液形成新的螯合物时，其荧光明显增强而持久。用延迟测量的方法可以消除样品自身的早期背景荧光而大大提高检测灵敏度。时间分辨荧光测量技术明显提高了荧光免疫分析技术的灵敏度和特异性，是荧光免疫分析的一个重要发展。Kakabakos 等<sup>[3]</sup>和 Xu 等<sup>[4]</sup>分别建立了时间分辨荧光多组分免疫分析法，可以同时分析血清或溶液中的四种组分。Arguilla 等<sup>[5]</sup>进一步证明在由核酸碱基到  $\text{Tb}^{3+}$  的无辐射能量转移中，未配对的鸟嘌呤（G）起到了不可替代的作用。

荧光免疫分析可在不同的相态下进行反应分析，根据反应系统的物理

状态的不同，可以分为均相荧光免疫分析和非均相荧光免疫分析。在现有的免疫检测中，固相免疫法以 RIA 和 EIA 应用最为广泛，但非均相免疫分析需要一个将结合与未结合游离标记物的分离步骤，即在定性或定量分析之前必须尽可能的去除过量的未结合的标记试剂，从而提高信噪比和分析的灵敏度，因而操作相对复杂。分析游离相与结合相是关键，也最容易产生误差。均相荧光免疫分析(homogeneous fluorescence immunoassay, hFIA)是利用荧光的一些特殊的理化性质，如荧光的激发、吸收、淬灭、偏振等而设计建立的一类实验方法，在反应完成之后，无需将已结合的和游离的标记物加以分离，可以直接进行测定，易于实现自动化。如 Park 等<sup>[6]</sup>建立了一种基于荧光偏振的均相荧光分析法，将一种绿色荧光蛋白的突变体与蛋白对中的一种蛋白融合表达，通过荧光偏振的增加来判断蛋白复合物的形成，进而确定复合物的平衡解离常数，整个操作过程都在均相水溶液环境中进行，能够对蛋白 - 蛋白相互作用的强度进行量化。

## 2. 抗体和小分子抗体

抗体存在于人和脊椎动物的血清之中，是免疫系统的重要组成成分。最早是由德国生物学家 Behring 于 1890 年研究白喉外毒素时发现的。由于抗体与抗原能够特异性的非共价结合，而且抗体分子的结合特异性极为精确，可准确识别各种不同的抗原，还可以激活细胞的其他防卫系统以消灭抗原，因此抗体在基础研究和临床诊断中获得了广泛的重视和应用。作为分析试剂，抗体的特异性是无与伦比的。在免疫分析中，样品不需要或只要作简单的预处理；抗原抗体复合物的稳定常数一般为  $10^9$ ，有些可达  $10^{14-15}$ ，有较高的稳定性，这两点奠定了免疫分析高度灵敏和高度特异的基础。

### 2.1 抗体的分子结构、功能特点及分类

所有的抗体分子都具有相似的基本结构，都是由两条重链和两条轻链组

成的免疫球蛋白单体，其典型结构类似于“Y”型（图 2）。每条重链和轻链均由可变区和恒定区组成，进一步序列分析发现每条链均由约 110 个氨基酸构成的结构域（domains）重复组成，每个结构域内相隔 60 个氨基酸有两个链内二硫键连接，是免疫球蛋白折叠的重要基础。

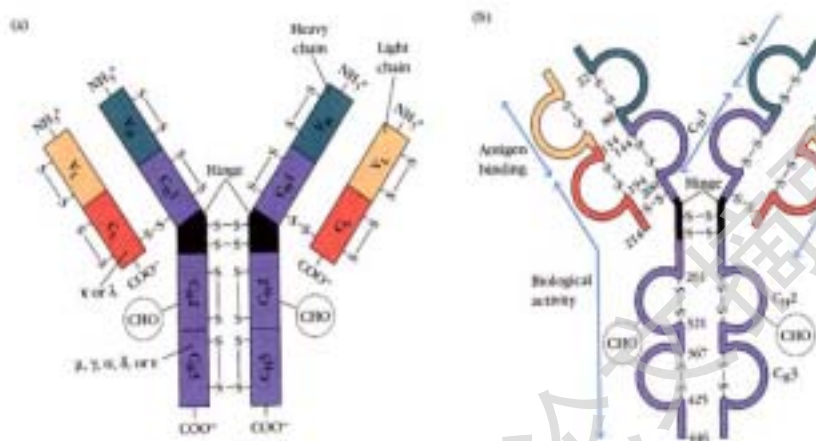


图 2 抗体分子的典型结构

（引自免疫学信息网 [www.immuneweb.xxmc.edu.cn](http://www.immuneweb.xxmc.edu.cn)）

Figure 2 Model structure of antibody molecule

在重链可变区（heavy chain variable region，VH）和轻链可变区（light chain variable region，VL）中，存在着氨基酸序列高度变化的片段，称为超变区（hypervariable region，HVR），超变区以外的氨基酸序列相对保守，称为骨架区（framework region，Fr）。VH 和 VL 各有三个超变区和四个骨架区。抗体分子的二级结构由片层和环状结构（loop）组成，没有螺旋结构。链经过一段长度不等的环状区反向平行折叠，并与相邻的链通过氢键相连，从而形成反平行的片层。每个片层结构由 3~4 条链组成，两个片层结构通过疏水作用及二硫键的作用形成一个结构域。可变区和恒定区的结构域相似，但 V 区比 C 区多一对链和一个环状结构，环状结构的部位就是超变区的抗原结合位点所在的部位（图 3）。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库